



(51) 国際特許分類7 A61K 38/17	A1	(11) 国際公開番号 WO00/38704 (43) 国際公開日 2000年7月6日 (06.07.00)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/07199</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月22日 (22.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/369585 1998年12月25日 (25.12.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 松本寛和 (MATSUMOTO, Hirokazu) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1204号 Ibaraki, (JP)</p> <p>北田千恵子 (KITADA, Chieko) [JP/JP] 〒590-0073 大阪府堺市南向陽町1丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>日沼州司 (HINUMA, Shuji) [JP/JP] 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 高橋秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町 2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: USE OF PEPTIDE</p> <p>(54) 発明の名称 ペプチドの用途</p> <p>(57) Abstract Use of a polypeptide recognized as a ligand by a G protein-coupled receptor protein. Because of having an effect of promoting the secretion of oxytocin, this ligand polypeptide is useful as drugs for ameliorating, preventing and treating various diseases relating to the oxytocin secretion such as week pains, atonic bleeding, before or after expulsion of placenta, uterine recovery failure, etc.</p>		

(57)要約

本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識するポリペプチドの用途に関し、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌の促進作用を有するため、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全などのオキシトシン分泌に関係する各種疾患の改善、予防および治療薬として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	CW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CR	コスタ・リカ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CY	キプロス	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
DK	デンマーク	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
		KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
		KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

ペプチドの用途

5 技術分野

本発明は、生理活性ペプチドの用途に関する。さらに詳しくは、本発明は、G蛋白質共役型レセプター（受容体と呼ぶこともある）蛋白質に対するリガンド・ポリペプチドを含有するオキシトシン分泌調節剤などに関する。

10 背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているグアニンヌクレオチド結合性蛋白質（guanine nucleotide-binding protein、以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行う。

15 また、これらのレセプターは、7個の細胞膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプター（7 TMR）と総称される。

このようなG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一つとして、p h GR 3（またはG P R 1 0と呼ばれることもある）遺伝子によってコードされるヒト型レセプター蛋白質〔ゲノミックス（Genomics）、第29巻、第335頁（1995年）〕、

20 およびそれに対応するラット型レセプター蛋白質UHR-1〔バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション（Biochem. Biophy. Res. Commun.）、第209巻、第606頁（1995年）〕が知られている。

また、上記のp h GR 3およびUHR-1に対するリガンドとして機能する生理活性ペプチドとして、P r R P〔ネイチャー（Nature）、第393巻、272

25 -276頁（1998）〕が知られている。

P r R Pは、*in vitro* の下垂体細胞培養系において下垂体前葉ホルモンに対しては、特異的にプロラクチン放出作用が認められている〔ネイチャー（Nature）、第393巻、272-276頁（1998）〕が、他の生理作用、特に下垂体後

葉ホルモンに対する影響は明らかではない。また、下垂体後葉ホルモンであるオキシトシンを調節する内因性の調節ホルモンは現在のところ不明である。

発明の開示

- 5 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、まず、認識部位の異なるPrRPに対する特異的なモノクローナル抗体を2種類作製し、PrRPの高感度測定系（Sandwich-EIA系）を作製した（特願平10-140293号，WO 99/60112号）。この測定系を用いてラットでのPrRPの組織分布を調べた結果、既報〔ネイチャー（Nature），第393巻，
- 10 272頁（1998）〕通り視床下部などに高濃度に分布したほか、下垂体後葉においても高濃度のPrRPの存在を確認した。このことは、PrRPが下垂体後葉ホルモンの分泌になんらかの影響を与えるものと考えられた。さらに、PrRPをラットに脳室内投与したところ血中のオキシトシン濃度が上昇し、PrRPがオキシトシンの放出を調節する作用を有することを見いだした。
- 15 すなわち、本発明は、
- （1）G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩を含有するオキシトシン分泌調節剤；
- （2）G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩が、配列番号：44で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸
- 20 配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩である前記（1）記載のオキシトシン分泌調節剤；
- （3）配列番号：44で表されるアミノ酸配列が、配列番号：3、18または32である前記（2）記載のオキシトシン分泌調節剤；
- （4）G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩が、
- 25 配列番号：45で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩である前記（1）記載のオキシトシン分泌調節剤；
- （5）配列番号：45で表されるアミノ酸配列が、配列番号：6、21または35である前記（4）記載のオキシトシン分泌調節剤；

- (6) オキシトシン分泌促進剤である前記(1)記載のオキシトシン分泌調節剤；
- (7) 微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶または乳汁うっ滞の改善、予防または治療薬である前記(6)記載のオキシトシン分泌促進剤；
- 5 (8) オキシトシン分泌を調節するためのG蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩の使用；
- (9) オキシトシン分泌調節剤を製造するためのG蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩の使用；
- (10) G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩を、オキシトシン分泌不全に関係する疾患を有する哺乳動物に投与することを特徴とするオキシトシン分泌を調節する方法などに関する。
- 10

図面の簡単な説明

- 図1は、PrRP(19P2-L31)のラット組織含量を示す。
- 15 図2は、PrRP(19P2-L31)を10nmolラットの脳室内に投与した時の血中オキシトシン濃度の変動を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体が存在する場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。
- 20

- | | |
|---------|---------------|
| DNA | : デオキシリボ核酸 |
| 25 cDNA | : 相補的デオキシリボ核酸 |
| A | : アデニン |
| T | : チミン |
| G | : グアニン |
| C | : シトシン |

	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
5	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	EIA	: エンザイムイムノアッセイ
	GlyまたはG	: グリシン
	AlaまたはA	: アラニン
	ValまたはV	: バリン
10	LeuまたはL	: ロイシン
	IleまたはI	: イソロイシン
	SerまたはS	: セリン
	ThrまたはT	: スレオニン
	CysまたはC	: システイン
15	MetまたはM	: メチオニン
	GluまたはE	: グルタミン酸
	AspまたはD	: アスパラギン酸
	LysまたはK	: リジン
	ArgまたはR	: アルギニン
20	HisまたはH	: ヒスチジン
	PheまたはF	: フェニルアラニン
	TyrまたはY	: チロシン
	TrpまたはW	: トリプトファン
	ProまたはP	: プロリン
25	AsnまたはN	: アスパラギン
	GlnまたはQ	: グルタミン
	pGlu	: ピログルタミン酸
	Me	: メチル
	Et	: エチル

Bu : ブチル

Ph : フェニル

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

- | | | |
|----|----------------------|--------------------------------|
| 5 | BHA | : ベンズヒドリルアミン |
| | pMBHA | : p-メチルベンズヒドリルアミン |
| | Tos | : p-トルエンスルフォニル |
| | CHO | : ホルミル |
| | HONB | : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシ |
| 10 | | イミド |
| | OcHex | : シクロヘキシルエステル |
| | Bzl | : ベンジル |
| | Cl ₂ -Bzl | : ジクロロベンジル |
| | Bom | : ベンジルオキシメチル |
| 15 | Z | : ベンジルオキシカルボニル |
| | Br-Z | : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル |
| | Boc | : t-ブチルオキシカルボニル |
| | DCM | : ジクロロメタン |
| | HOBT | : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール |
| 20 | DCC | : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド |
| | TFA | : トリフルオロ酢酸 |
| | DIEA | : ジイソプロピルエチルアミン |
| | Fmoc | : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル |
| | DNP | : ジニトロフェニル |
| 25 | Bum | : ターシャリーブトキシメチル |
| | Trt | : トリチル |

本明細書において、「実質的に同一」とは、ポリペプチドの活性（例えば、リガンドと受容体の結合活性など）またはポリペプチドのオキシトシン分泌調節作

用（例えば、オキシトシン分泌促進作用、オキシトシン分泌阻害作用など）などが、実質的に同じであることを意味する。従って、「実質的に同一」のアミノ酸配列とは、ポリペプチドの活性、例えば、リガンドと受容体の結合活性（例えば、リガンドと受容体との結合活性など）やポリペプチドのオキシトシン分泌調節作用（例えば、オキシトシン分泌促進作用、オキシトシン分泌阻害作用など）などが、実質的に同じである（著しい変化を生じていない）状態が保たれる限りの変異を有していてもよいアミノ酸配列を意味する。

一般に、ポリペプチド配列中におけるアミノ酸の置換、欠失または挿入（付加）などの変異は、そのポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな（著しい）変化をもたらさないことがしばしばあることは、よく知られた事実である。該置換の例としては、あるアミノ酸が性質（特性）の似ている他のアミノ酸で置換されたものが挙げられ、一般的には、特性の類似性が強いアミノ酸相互間で置換が行われる場合ほど、その置換が置換前の元のポリペプチドにおよぼす特性の変化は小さいと考えられている。

アミノ酸は、その特性の類似性を一つの基準にして例えば次のようなクラスに分類される。（i）非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。（ii）極性（中性）アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。（iii）陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。（iv）負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

本明細書中で対象とするアミノ酸配列中のアミノ酸の「実質的に同一」な置換物としては、例えばそのアミノ酸が属するクラスのうち特性の似ている他のアミノ酸類から選ばれることが多い。

本発明においては、元の（無変異の）ポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に重大な（著しい）変化をもたらさないような置換、欠失または挿入等のアミノ酸配列における変異の結果得られるポリペプチド（変異型ポリペプチド）は、そのような変異を有していない元の（無変異の）ポリペプチドと実質的に同一で

あると見なされ、またその変異型ポリペプチドのアミノ酸配列は、元の（無変異の）ポリペプチドのアミノ酸配列と実質的に同一であると見なされる。

なお、本発明におけるポリペプチド中の構成アミノ酸は、D体またはL体のいずれであってもよいが、特にことわらない限り通常はL体が好ましい。

- 5 本発明におけるポリペプチドは、G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、即ちG蛋白共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩であり、具体的には例えば、配列番号：44または配列番号：45で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩（以下、単にリガンドポリペプチドまたはポリペプチドと略称する場合がある）が挙げられる。
- 10

- ここで、G蛋白質共役型レセプター蛋白質とは、7個の細胞膜貫通領域を有する共通した構造をもっているレセプター蛋白質で、その多くは共役しているグアニンヌクレオチド結合性蛋白質（guanine nucleotide-binding protein）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行うものである。
- 15

配列番号：44で表される該アミノ酸配列として好ましくは、配列番号：3、18または32で表されるアミノ酸配列が挙げられ、とりわけ、配列番号：32で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列が挙げられる。

- 20 配列番号：45で表される該アミノ酸配列として好ましくは、配列番号：6、21または35で表されるアミノ酸配列が挙げられ、とりわけ、配列番号：35で表されるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列が挙げられる。

- 本発明における該ポリペプチドとしては、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる組織（例えば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するポリペプチドであって、具体的には例えば、配列番号：44または配列番号：45で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：3、18もしくは32または配列番号：6、21または35で表されるアミ
- 25

ノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであればよい。

例えば、本発明における該リガンドポリペプチドとしては、配列番号：44または配列番号：45で表わされるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：3、18もしくは32または配列番号：6、21もしくは35で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの他に、配列番号：44または配列番号：45で表わされるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：3、18もしくは32または配列番号：6、21もしくは35で表されるアミノ酸配列と約50～99.9%（好ましくは70～99.9%、より好ましくは80～99.9%、さらに好ましくは90～99.9%）の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：44または配列番号：45で表わされるアミノ酸配列、好ましくは、配列番号：3、18もしくは32または配列番号：6、21もしくは35で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが挙げられる。該活性としては、例えばレセプター結合活性、シグナル伝達活性など、該リガンドポリペプチドが有する活性が挙げられる。活性が「実質的に同質」とは、該レセプター結合活性などの特性が同質であることを示す。従って、該レセプター結合活性には著しくない程度の強弱が認められてもよく、また、該リガンドポリペプチドの分子量における相違は問題ではない。ヒトや温血動物の同じ属由来の実質的に同一のペプチドが、由来する種の違い（例えば、人種間の違い等）によりそのペプチドの本質的でないアミノ酸配列上の差異が認められることがあるが、本発明における該ポリペプチドとしては、本質的でないアミノ酸配列上の差異によるこれらのペプチドも包含する。

本発明のリガンドポリペプチドその製造法および用途を以下にさらに詳細に説明する。

本発明のリガンドポリペプチドとして、具体的には例えば、配列番号：44または配列番号：45で表わされるアミノ酸配列を含有するラット、ウシ、ヒトまたはマウス由来のポリペプチドなどが挙げられる。（なお、配列番号：44において第3番目のXaaはThrもしくはAla、第5番目のXaaはArgもし

くはGln、第10番目のXaaはIleもしくはThr、第21番目のXaaはThrもしくはAla、第22番目のXaaはGlyもしくはSerを示し、配列番号：45において 第10番目のXaaはThrもしくはAla、第11番目のXaaはGlyもしくはSerを示す。)

5 また、本発明の該リガンドポリペプチドには、

(i) 配列番号：44で表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

10 (ii) 配列番号：44で表わされるアミノ酸配列中の1個以上23個以下、好ましくは1個以上16個以下、より好ましくは1個以上11個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：44で表わされるアミノ酸配列に1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加した(挿入された)アミノ酸配列、さらには、

15 (iv) 上記(i)、(ii)または(iii)のポリペプチド中の構成アミノ酸(特にその側鎖)に修飾を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩も含まれる。

さらに、本発明のリガンドポリペプチドには、

20 (v) 配列番号：45で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(vi) 配列番号：45で表わされるアミノ酸配列中の1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(vii) 配列番号：45で表わされるアミノ酸配列に1個以上10個以下、好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が付加した(挿入された)アミノ酸配列、さら

25 には、

(viii) 上記(v)、(vi)または(vii)のポリペプチド中の構成アミノ酸(特にその側鎖)に修飾を有するアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩も含まれる。

本発明の該リガンドポリペプチドは、そのアミノ酸配列中に上記(i)ないし

(viii) の置換、欠失、付加、修飾などを意図的または偶発的に施すことにより、熱やプロテアーゼに対する安定型リガンドポリペプチドや、該リガンドポリペプチドの有する生理活性が高まった高活性型リガンドポリペプチドに変異（変換）させることが可能である。本発明における該リガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、これら変異型リガンドポリペプチドも包含する。

本明細書において、ペプチドの標記は、その慣例に従い、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）として記載する。

本発明のポリペプチド中の構成アミノ酸における修飾の例としては、例えば、GlnのN端側が生体内で切断され、該Glnがピログルタミン酸化したものなどが挙げられる。

本発明におけるポリペプチド、例えば配列番号：44または配列番号45で表されるポリペプチドは、C末端アミノ酸残基の α -カルボキシル基が、通常はカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端アミノ酸残基の該カルボキシル基がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。 $-\text{COOR}$ で表される該エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピルもしくは n -ブチルなどの C_1 - $_6$ アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_3 - $_8$ シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_6 - $_{12}$ アリール基、ベンジル、フェネチルなどのフェニル C_1 - $_2$ アルキル基、ベンズヒドリルなどのジフェニル- C_1 - $_2$ アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_1 - $_2$ アルキルなどの C_7 - $_{14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが挙げられる。

また、本発明におけるポリペプチド、例えば配列番号：44または配列番号45で表されるポリペプチドが、C末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば前述のC末端アミノ酸残基のエステルなどと同様である。

本発明のリガンドポリペプチドとしては特にC末端アミノ酸残基のカルボキシ

ル基がアミドであるペプチドが好ましい。なかでも、配列番号：3、6、18、21、32または35で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのC末端アミノ酸残基のカルボキシル基がアミドであるポリペプチドが好ましい。

本発明のポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）または酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

本発明のリガンドポリペプチドは、(i) ヒトまたは温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することができ、また、(ii) 公知のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。さらにまた、(iii) 該ポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養する方法（後述）によって製造することもできる。

(i) 該リガンドポリペプチドを、ヒトまたは温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトまたは温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

(ii) 該リガンドポリペプチドは、自体公知のポリペプチドの合成法に従って製造することもできる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。即ち、リガンドポリペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。この場合の公知の縮合方法や保護基の脱離方法としては例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

① M. Bodanszky および M. A. Ondetti : ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

② Schroeder および Luebke : ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③ 泉屋信夫他 : ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株) (1975年)

④ 矢島治明 および榊原俊平 : 生化学実験講座 1, タンパク質の化学IV, 205, (1977年)

⑤ 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

上記 (ii) の該リガンドポリペプチドの合成法として具合的には、例えば次の方法などが挙げられる。

該リガンドポリペプチドのアミド体を合成するには、アミド形成に適したペプチド合成用樹脂を用いるとよい。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル) フェノキシ樹脂などが挙げられる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を公知の適当な保護基で保護したアミノ酸を、自体公知の各種縮合方法に従い、目的とするペプチドの配列通りに該樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すとともに各種保護基を除去し、目的のポリペプチドを取得することができる。前述の保護されたアミノ酸を縮合させるには、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが挙げられる。

これらによる活性化には、ラセミ化抑制添加剤 (例えば、HOBt) とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用可能な公

知の溶媒から適宜選択すればよい。該溶媒としては、例えばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、
5 ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが挙げられる。該縮合反応における反応温度は、公知のペプチド結合形成反応に使用可能な温度範囲から適宜選択すればよく、通常約-20℃～50℃の範囲が挙げられる。該活性化されたアミノ酸誘導体は、通常1.5～4倍過剰で用いられる。縮合反応の達成度は公知のニンヒドリン反応を用いて確認することができ、その結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、
10 無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化し、後の反応に影響をおよぼさないようにすることもできる。

該ペプチド合成の際の原料となるアミノ酸のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、tert-アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニ
20 トロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、例えば前述のC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、tert-ブトキシカルボニルヒドラジド、
25 トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、例えばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C₁₋₆)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基な

どが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、例えばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、tert-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えばBzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、tert-ブチルなどが挙げられる。

- 5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

本発明におけるリガンドポリペプチドとしては、例えば、上記した配列番号：44または配列番号：45で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の
10 アミノ酸配列を含有するポリペプチドと同様のオキシトシン分泌調節作用を有している限り、そのアミノ酸配列に変異を有するどのようなペプチドであってもよい。このようなペプチドとしては例えば、配列番号：44で表されるアミノ酸配列を有するペプチドから1ないし20個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。具体的には例えば、(a) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第2番目から第31番目のアミノ酸配列を有する
15 ペプチド、(b) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第3番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(c) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第4番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(d) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第5番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(e) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第6番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(f) 配列番号：44で表される
20 アミノ酸配列の第7番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(g) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第8番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(h) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第9番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(i) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第10番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、
25 (j) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第11番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(k) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第12番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(l) 配列番号：

44で表されるアミノ酸配列の第13番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(m) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第14番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(n) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第15番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(o) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第16番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(p) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第17番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(q) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第18番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(r) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第19番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(s) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第20番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(t) 配列番号：44で表されるアミノ酸配列の第21番目から第31番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

配列番号：44で表されるアミノ酸配列としてより好ましい、配列番号：3、18または32についても、配列番号：44で表されるアミノ酸配列について例示したものと同様である。

また、配列番号：45で表されるアミノ酸配列を有するペプチドから1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。具体的には、例えば、(a) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第2番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(b) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第3番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(c) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第4番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(d) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第5番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(e) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第6番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(f) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第7番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(g) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第8番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(h) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第9番目から第20番目のアミノ酸配

列を有するペプチド、(i) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第10番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチド、(j) 配列番号：45で表されるアミノ酸配列の第11番目から第20番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

- 5 配列番号：45で表されるアミノ酸配列としてより好ましい、配列番号：6、21または35についても、配列番号：45で表されるアミノ酸配列について例示したようにそのアミノ酸配列に変異を有していてもよい。

本発明におけるリガンドポリペプチドは、さらに、他の蛋白質（例、機能または性質がよく知られている公知の蛋白質）との融合蛋白質であってもよい。

10

本発明におけるリガンドポリペプチドをコードするDNAとしては、本発明における配列番号：44または配列番号：45で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNA

15

ライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接RT-PCR (reverse transcription PCR) 法によって増幅することもできる。

20

より具体的には、配列番号：1または配列番号：15のアミノ酸配列を含有するラット全脳あるいはウシ視床下部由来のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

25

ここで、配列番号：2において第129番目のRはGまたはAを、第179番目および240番目のYはCまたはTを示す。第179番目のYがCのとき、配列番号：1で表されるアミノ酸配列をコードし、第179番目のYがTのとき、配列番号：15で表されるアミノ酸配列をコードする。

また、配列番号：3、4、5、6、7または8で表されるアミノ酸配列を含有するウシ由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：9、10、11、12、13または14で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いら

れる。

ここで、配列番号：9、10、11の第63番目のRおよび配列番号：12、13、14の第29番目のRはGあるいはAを示す。

5 また、配列番号：8、18、19、20、21、22または23で表されるラット由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：17、24、25、26、17、28または29で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

さらに、配列番号：30、32、33、34、35、36または37で表されるヒト由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：31、38、10 39、40、41、42または43で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

また、本発明における配列番号：1、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するウシ型ポリペプチド、配列番号：16で表されるアミノ酸配列を含有するラット型ポリペプチド、または配列番号：30で表されるアミノ酸配列を含有するヒト型ポリペプチドをコードするDNAの中で例えば6個以上90個以下
15 (好ましくは6個以上60個以下、より好ましくは9個以上30個以下、さらに好ましくは12個以上30個以下)の部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

(iii) 本発明におけるポリペプチドをコードするDNAは、以下の遺伝子工学的
20 的手法によって製造することもできる。

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニング(クローン化)は、以下の方法に従って行えばよい。即ち、(1)該ポリペプチドの部分塩基配列を有するDNAを合成し、これをプライマーとしてPCR法によって該ポリペプチドを完全にコードするDNAを増幅するか、または、(2) cDNAもしくは
25 はゲノムDNA、またはそのDNA断片を適当なベクターに組み込んで得られるDNAライブラリーを、例えば該リガンドポリペプチドの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションを行うことにより選別すればよい。該ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor

Lab. Press, 1989) などに記載の方法に従って行えばよい。また、DNAライブラリーとして市販のものを使用する場合は、添付の使用説明書に記載の方法に従って行えばよい。

クローン化された該ポリペプチドをコードするDNAは、そのまま使用しても、
5 または所望により制限酵素で消化した後もしくはリンカーDNAを付加した後に使用してもよい。該DNAは、その5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

10 該ポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクターは、例えば、(1) 本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(2) このDNA断片を公知の適当な発現ベクター中のプロモーター配列の下流に連結することにより製造することができる。

該ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、
15 λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。該プロモーターとしては、目的のポリペプチドをコードする遺伝子の発現に用いる宿主において、適切
20 に機能するプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、
25 PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどがそれぞれ好ましく挙げられる。なお、目的のポリペプチドをコードす

る遺伝子を効率よく発現させるためには、エンハンサーを使用することが好ましい。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、Omp A・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクター α ・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築されたポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

形質転換する際の宿主としては、例えば公知のエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが挙げられる。

該エシェリヒア属菌の具体例としては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2・DH 1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 第60巻, 160頁 (1968年)], J M 1 0 3 [ヌクイレック・アシッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 第9巻, 309頁 (1981年)], J A 2 2 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 第120巻, 517頁 (1978年)], H B 1 0 1 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 第41巻, 459頁 (1969年)], C 6 0 0 [ジェネティックス (Genetics), 第39巻, 440頁 (1954年)] などが挙げられる。

該バチルス属菌の具体例としては、例えばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M I 1 1 4 [ジーン (gene), 第24巻, 255頁 (1983年)], 2 0 7 - 2 1 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 第95巻, 87頁 (1984年)] などが挙げられる。

該酵母としては、例えばサッカロマイセス セレビスイエ (*Saccharomyces cerevisiae*) A H 2 2, A H 2 2 R⁻, N A 8 7 - 1 1 A, D K D - 5 D, 2 0 B

— 1 2 などが挙げられる。

該昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが挙げられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 第315巻, 592頁 (1985年) 〕。

5 該動物細胞としては、例えばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(dhfr⁻CHO細胞), マウスL細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトFL細胞などが挙げられる。

10 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー, 第69巻, 2110頁 (1972年) 、ジーン, 第17巻, 107頁 (1982年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

バチルス属菌を形質転換するには、例えばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 第168巻, 111頁 (1979年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

15 酵母を形質転換するには、例えばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー, 第75巻, 1929頁 (1978年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

昆虫細胞を形質転換するには、例えばバイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 第6巻, 47頁 (1988年) などに記載の方法に従って行なえばよい。

20 動物細胞を形質転換するには、例えばヴィロロジー (Virology) , 第52巻, 456頁 (1973年) に記載の方法に従って行なわれる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

25 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際の培地としては液体培地が好ましく、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他を含有するよう調製される。該炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが、該窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が、該無機物と

しては、例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、該培地中には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを必要に応じて添加してもよい。該培地のpHは形質転換体が生育するpHであればいずれでもよいが、pHは通常約5～8が好ましい。

- 5 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431頁, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972年〕が好ましい。必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば3β-インド
- 10 リルアクリル酸のような薬剤を培地に加えて培養してもよい。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 15 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 第77巻, 4505頁 (1980年)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc.
- 20 Natl. Acad. Sci. USA), 第81巻, 5330頁 (1984年)] が挙げられる。

培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

- 宿主が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect
- 25 Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 第195巻, 788頁 (1962頁)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約5～

20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 第122巻, 501頁 (1952年)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 第8巻, 396頁 (1959年)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 第199巻, 519頁 (1967年)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 第73巻, 1頁 (1950年)〕などが挙げられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

10 上記培養物（培養液および培養菌体あるいは培養細胞）からポリペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法に従って行なえばよい。

該ポリペプチドが、培養菌体中あるいは培養細胞中に蓄積される場合は、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁後、公知の超音波処理、リゾチーム処理および／または凍結融解処理などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、公知の遠心分離やろ過などの操作により、目的のポリペプチドまたはその部分ペプチドは、抽出液として得ることができる。該緩衝液の中には、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100（和光純薬（株）など、登録商標：以下、TMと省略することがある）などの界面活性剤を必要に応じて添加して用いてもよい。

20 一方、培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養後、まず培養菌体あるいは培養細胞と培養上清とを公知の方法により分離し、培養上清として得ることができる。

得られる培養上清または抽出液中に含まれる、ポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、（1）塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、（2）透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、（3）イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、（4）アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、（5）逆相高速液体クロマトグラフィー

などの疎水性の差を利用する方法、(6)等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

5 該ポリペプチドが遊離体で得られる場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

10 なお、該ポリペプチドの精製前または精製後、これに公知の方法に従い適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、該ポリペプチドに任意の修飾を加えたり、該ポリペプチド中の配列を部分的に除去することもできる。該蛋白質修飾酵素としては、例えばトリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが挙げられる。。このようにして得られる変異ポリペプチドの活性は、レセプターとの結合実験や特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ法などにより測定することができる。

15 さらにまた、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌の調節作用、つまり、オキシトシン分泌の促進および抑制作用を有する。即ち、本発明におけるリガンドポリペプチドは、後述の実施例から明らかなように、オキシトシン分泌の促進作用を有するため、オキシトシン分泌不全に関する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。一方、本発明におけるリガンドポリペプチドは、そのレセプター蛋白質との親和性が強いため、投与量が増えるとオキシトシン分泌に対し脱感作(desensitization)が起こる結果、オキシトシン分泌を抑制する作用も有する。この場合、オキシトシン過剰分泌に関する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。

25 従って、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌促進剤として、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞、分娩誘発、乳汁分泌不全、不妊症、月経困難症、流産、外傷後ストレス症候群など、好ましくは、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など、特に好ましくは微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全などのオキシトシン分泌に関する各種疾患の改善、予防および治療薬として有用である。

また、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌抑制剤として、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群、月経困難症など、好ましくは、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群などのオキシトシン分泌に関係する各種疾患の改善、予防および治療薬として
5 有用である。

その他、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、牛、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産など
10 への応用も期待される。

本発明におけるポリペプチドを前述の医薬または動物薬として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該ポリペプチドまたはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。
15 20

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤製造法にしたがって処
25

方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに無菌的に充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒト、哺乳動物（例、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明におけるポリペプチドの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与する場合、一般的に出産時の陣痛微弱の妊婦（体重60kgに対し）においては、一回につき通常約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では出産時の陣痛微弱の妊婦（体重60kgに対し）においては、一回につき通常約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

本発明で用いられるG蛋白共役型レセプター蛋白質（以下、単にレセプター蛋白質と称する場合がある）またはリガンドポリペプチドは例えば、WO 96/05302またはWO 97/24436に記載に基づいて、調製することができる。

以下に、本発明のレセプター蛋白質に対する本発明のリガンドポリペプチドと該レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなるオキシトシン分泌調節剤の取得方法およびその用途に関して記載する。

5 本発明のレセプター蛋白質に対する本発明のリガンドポリペプチドと該レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩には本発明のリガンドポリペプチドの機能（例、オキシトシン分泌作用等）を促進する化合物またはその塩および本発明のリガンドポリペプチドの機能（例、オキシトシン分泌作用等）を阻害する化合物またはその塩が含まれる。

10 本発明のリガンドポリペプチドはオキシトシン分泌調節作用（オキシトシン分泌促進作用、オキシトシン分泌阻害作用など）など有するため、本発明のリガンドポリペプチドのオキシトシン分泌作用を促進する化合物またはその塩は、オキシトシン分泌促進剤として、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞、分娩誘発、乳汁分泌不全、不妊症、月経困難症、流産、外傷後ストレス症候群など、好ましくは、微弱陣痛、弛緩出血、
15 胎盤娩出、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など、特に好ましくは、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全などの改善、予防または治療剤などの医薬として使用できる。

一方、本発明のリガンドポリペプチドのオキシトシン分泌作用を阻害する化合物またはその塩は、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、
20 早産、Prader-Willi症候群、月経困難症など、好ましくは、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群などの改善、予防または治療剤などの医薬として使用できる。

従って、本発明のリガンドポリペプチドは、本発明のリガンドポリペプチドの機能を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。
25

本発明のリガンドポリペプチドの機能を促進または阻害する化合物またはその塩は、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（例えば、p h G R 3、U H R - 1 など（WO 96/05302、WO 97/24436））と本発明のリガンドポリペプチドとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングすることによ

って得ることができる。

以下に該スクリーニング方法について記載する。

5 G蛋白質共役型レセプター蛋白質〔例えば、p h G R 3、U H R - 1 など（W O 9 6 / 0 5 3 0 2、W O 9 7 / 2 4 4 3 6）〕発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質〔例えば、p h G R 3、U H R - 1 など（W O 9 6 / 0 5 3 0 2、W O 9 7 / 2 4 4 3 6）〕との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

10 このような化合物には、(1) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C a ²⁺遊離、細胞内c A M P 生成、細胞内c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物、(2) 該細胞刺激活性を有しない化合物
15 物（いわゆる、レセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、(3) 本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、(4) 本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は(i) レセプター蛋白質またはその塩と、本発明のリガンド
20 ポリペプチドまたはその塩とを接触させた場合と(ii) レセプター蛋白質またはその塩と、本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩および試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩とレセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

25 本発明のスクリーニング方法においては、(i) と(ii) の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、

①標識した本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩を、レセプター蛋白質等

に接触させた場合と、標識した本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識した本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩の該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩とレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識した本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩を、レセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩および試験化合物をレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩とレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明のリガンドポリペプチドを、レセプター蛋白質などをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識した本発明のリガンドポリペプチドおよび試験化合物をレセプター蛋白質などをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識した本発明のリガンドポリペプチドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドとレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

上記のスクリーニング方法のより具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるレセプター蛋白質等としては、前記したレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、レセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋

白質等などが適している。

レセプター蛋白質等を製造するには、レセプターをコードするDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約
5 されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、
10 メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に
15 従って行なうことができる。

したがって、上記のスクリーニング方法において、レセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

20 上記のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

レセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、
25 動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-E l v e h j e m型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチブ

レスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩とレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングするためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンドなどが用いられる。

具体的には、本発明のリガンドポリペプチドとレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まずレセプター蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-

80™ (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。

5 0.1ml~1.0mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~50000cpm)の標識したリガンドを添加し、同時に 10^{-4} M~ 10^{-10} Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃~50℃、望ましくは約4℃~37℃で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - NSB$)を100%とした時、特異的結合量($B - NSB$)が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

10

また、本発明のリガンドポリペプチドとレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pH

20 の低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、レセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。ま

25

た、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

5 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。レセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

10 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

15 本発明のリガンドポリペプチドとレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、レセプター蛋白質等、レセプター蛋白質等を含有する細胞、またはレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

20 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

25 レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S] などて標識した本発明のリガンドポリペプチド

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液

にて1 μ Mに希釈する。

④リガンド標準液

本発明のリガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

5 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 μ l加えた後、標識リガンドを5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀: 最大結合量

本発明のレセプター蛋白質に対する本発明のリガンドポリペプチドと該レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩を前述のオキシトシン分泌調節剤として使用する場合は、常套手段に従って実施すればよい。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に或いは点鼻剤として使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味

剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 5 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤
- 10 などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤製造法にしたがって処方することができる。
- 15 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）など
- 20 と併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、
- 25 適当なアンプルに無菌的に充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、

イヌ、サル、チンパンジーなど) に対して投与することができる。

- 上記化合物またはその塩を含有するオキシトシン分泌調節剤の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与する場合、一般的に出産時の陣痛微弱の妊婦(体重 60 kg に対し) においては、一回につきオキシトシン分泌促進作用を有する化合物またはその塩を、通常約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回の投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では出産時の陣痛微弱の妊婦(体重 60 kg に対し) においては、一回につきオキシトシン分泌促進作用を有する化合物またはその塩を、通常約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与すればよい。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

- 15 〔配列番号：1〕

pBOV3 に含まれるウシ視床下部由来リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

- 〔配列番号：2〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド cDNA の全塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：3〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1 の第 23 ~ 53 番目のアミノ酸配列に対応している。

- 〔配列番号：4〕

- 25 ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1 の第 23 ~ 54 番目のアミノ酸配列に対応している。

- 〔配列番号：5〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1 の第 23 ~ 55 番目のアミノ酸配列に対応している。

- 〔配列番号：6〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1
の第34～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：7〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1
5 の第34～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：8〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：1
の第34～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：9〕

10 ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：3）をコードするDNA
の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：4）をコードするDNA
の塩基配列を示す。

15 〔配列番号：11〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：5）をコードするDNA
の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：6）をコードするDNA
20 の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：7）をコードするDNA
の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

25 ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド（配列番号：8）をコードするDNA
の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

ウシゲノム由来リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

ラット型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

ラット型リガンドポリペプチド cDNA の全塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

- 5 ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：16の第2
2～52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：19〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：16の第2
2～53番目のアミノ酸配列に対応している。

- 10 〔配列番号：20〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：16の第2
2～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：21〕

- 15 ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：16の第3
3～52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：22〕

ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：16の第3
3～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：23〕

- 20 ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：16の第3
3～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：24〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：18）をコードするDNAの塩基
配列を示す。

- 25 〔配列番号：25〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：19）をコードするDNAの塩基
配列を示す。

〔配列番号：26〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：20）をコードするDNAの塩基

配列を示す。

〔配列番号：27〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：21）をコードするDNAの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：28〕

ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：22）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

10 ラット型リガンドポリペプチド（配列番号：23）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

ヒト型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：31〕

ヒト型リガンドポリペプチドcDNAの全塩基配列を示す。

15 〔配列番号：32〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：30の第23～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：33〕

20 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：30の第23～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：34〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：30の第23～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：35〕

25 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：30の第34～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：36〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：30の第34～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：37〕

ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：30の第34～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：38〕

- 5 ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：32）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：33）をコードするDNAの塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：40〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：34）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

- 15 ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：35）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：36）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

- 20 ヒト型リガンドポリペプチド（配列番号：37）をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

- 25 本発明のリガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。ここで、第10番目のXaaはAlaまたはThr、第11番目のXaaはGlyまたはSer、第21番目のXaaはH、Gly、またはGlyArgを示す。

〔配列番号：45〕

本発明のリガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列中、第10番目のXaaはThrもしくはAla、第11番目のXaaはGlyもしくはSerを示す。

以下に実施例および製剤例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

5 実施例 1

ラット臓器中のPrRP (19P2-L31) の分布測定

ラット臓器は、雄性Wistarラットを断頭し各臓器を取り出して組織重量を測定後、直ちに液体窒素により凍結した。臓器からのPrRP (19P2-L31) の抽出方法は、まず、各臓器に対しその10倍量の蒸留水を添加し、沸騰水中で10分間加熱処理しプロテアーゼを失活させた後、水中で冷却した。水酢酸 (最終濃度1N)、ペプスタチン (最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$) およびホスホラミドン (最終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、ポリトロンホモジナイザー (KINEMATICA社製) にて1分間ホモジネート後、 $17,000\times g$ 、30分間遠心遠心した。得られた臓器抽出液を、Sep-Pak Plus C18カートリッジ265mg (Waters社製) で濃縮した後、Nature、第393巻、272~276頁(1998)およびWO 97/24436に記載のPrRP (19P2-L31) を既報 (特願平10-140293号, WO 99/60112号) のサンドイッチ-EIA系により定量した。臓器抽出液の濃縮は、まず4%酢酸含有86%エタノール4ml、メタノール4ml、蒸留水4ml、4%酢酸4mlを順次ながして活性化したSep-Pak Plus C18カートリッジに臓器抽出液を添加後、1.0mlの蒸留水で洗浄後、4%酢酸含有86%エタノール4ml、メタノール4mlで溶出し、37℃の窒素ガス気流下で濃縮する。濃縮画分を0.25mlのバッファーC [10%ブロックエース、0.2%BSA、0.4M NaCl、0.05% CHAPS [3-[(コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸] を含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7] 中で再構成しサンドイッチ-EIAにより定量した。結果を図1に示した。ラット下垂体後葉には $0.53\pm 0.06\text{ pmol}/\text{g tissue}$ (mean \pm SEM, n=5) のPrRP (19P2-L31) の免疫活性が検出された。

実施例 2

PrRP (19P2-L31) の第三脳室内投与が血漿中のオキシトシン分泌量に及ぼす影響

- 5 成熟Wistar系雄性ラット（手術時体重350～380g）をペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切歯用バーはインターオーラルラインから3.3mm低くした。頭蓋骨を露出し、第三脳室にガイドカニューレAG-12（内径0.4mm、外径0.5mm、エイコム）を埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、
10 その周囲4箇所アンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニューレ、AG-12を、その先端が第三脳室の上部に位置するように挿入した。定位座標は、PaxinosとWatson（1986）のアトラスに従い、インターオーラルラインより、AP: +7.1mm、L: 0.0mm、H: +2.0mmとした。ガイドカニューレは瞬間接着剤と歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に
15 固定した。ガイドカニューレにはステンレス製ダミーカニューレ、AD-12（外径0.35mm、エイコム社）を挿入し、キャプナイト（エイコム社）で固定した。術後、ラットは個別のケージで飼育した。

- ガイドカニューレを埋め込んでから約1週間飼育して術後の回復を待ち、自由行動下採血用の手術を行った。上記手術を施したラットをペントバルビタール5
20 0mg/kgの腹腔内投与にて麻酔した。解剖用パッドの上に背位に固定し、左側の頸静脈を露出させた。ポリエチレンチューブSP35（内径0.5mm、外径0.9mm、夏目製作所）を約30cmの長さに切り、200単位/mlのヘパリン含有生理食塩水で満たした後、頸静脈に約4.5cm挿入し固定した。チューブのもう一端は背側の皮下を通して頸部（背側）より露出させた。

- 25 術後一晩待ってから、PrRP (19P2-L31) 投与30分前に用量1mlのツベルクリン用注射筒と25ゲージ注射針（いずれもテルモ社）を用いて400μlの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め200単位/mlのヘパリンを含有する生理食塩水を20μl入れておいた。ラットの頭蓋骨に装着したキャプナイトとダミーカニューレを取り外し、代わりにテフロ

ンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.35mm、エイコム社）につないだステンレス製マイクロインジェクションカニューレ（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、0.5%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むリン酸緩衝生理食塩水またはPrRP（19P2-L31）10nmolを溶解させた0.5%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水を5 μ l/分の流速で計10 μ lを第三脳室に注入した。注入終了後15分待ってからマイクロインジェクションカニューレを取り外し、再びダミーカニューレをキャップナイトで固定した。脳室内投与を開始する直前、および脳室内投与の開始時点から5、15、30、45、60分後に頸静脈より400 μ lずつ採血した。採血した血液は微量高速冷却遠心機（MR-150、トミー精工）を用いて遠心（5,000rpm、10分間）し、上清（血漿）を回収した。血漿中に含まれるオキシトシンをラジオイムノアッセイ（Peninsula社）を用いて測定した。図2に示すごとく10nmolのPrRP（19P2-L31）を第三脳室に投与5分後において対象群に比し、約2倍の血中オキシトシン濃度の上昇がみられた。

製剤例1

20 日局注射用蒸留水50mlに実施例21で得られた化合物50mgを溶解した後、日局注射用蒸留水を加えて100mlとした。この溶液を滅菌条件下で濾過し、次にこの溶液1mlずつを取り滅菌条件下注射用バイアルに充填し凍結乾燥し密閉した。

25 製剤例2

日局注射用蒸留水50mlに実施例21で得られた化合物100mgを溶解した後、日局注射用蒸留水を加えて100mlとした。この溶液を滅菌条件下で濾過し、次にこの溶液1mlずつを取り滅菌条件下注射用バイアルに充填し凍結乾燥し密閉した。

産業上の利用可能性

本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌の調節作用（オキシトシン分泌の促進および抑制作用）を有する。即ち、本発明におけるリガンドポリペプチドは、まずオキシトシン分泌の促進作用を有するため、オキシトシン分泌不全に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。一方、本発明におけるリガンドポリペプチドは、そのレセプター蛋白質との親和性が強い

5 ため、投与量が増えるとオキシトシン分泌に対し脱感作（desensitization）が起こる結果、オキシトシン分泌を抑制する作用も有する。この場合、オキシトシン過剰分泌に関係する各種疾患の予防および治療薬に用いることができる。

10

従って、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌促進剤として、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞、分娩誘発、乳汁分泌不全、不妊症、月経困難症、流産、外傷後ストレス症候群、など、好ましくは、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など、特に好ましくは微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出、子宮復古不全などのオキシトシン分泌に関係する各種疾患の改善、予防および治療薬として有用である。

15

また、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌抑制剤として、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群、月経困難症など、好ましくは、過強陣痛、強直性子宮収縮、胎児仮死、子宮破裂、頸管裂傷、早産、Prader-Willi症候群などのオキシトシン分泌に関係する各種疾患の改善、予防および治療薬として有用である。

20

その他、本発明におけるリガンドポリペプチドは、オキシトシン分泌機能を調べるための検査薬としても、また、牛、ヤギ、ブタなどの畜産哺乳動物の乳汁の分泌促進剤などの動物薬としても有用であり、さらには該畜産哺乳動物体内で有用物質を生産させ、これをその乳汁中への分泌することによる有用物質生産などへの応用も期待される。

25

請求の範囲

1. G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩を含有するオキシトシン分泌調節剤。
- 5 2. G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩が、配列番号：44で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩である請求項1記載のオキシトシン分泌調節剤。
3. 配列番号：44で表されるアミノ酸配列が、配列番号：3、18または32
10 である請求項2記載のオキシトシン分泌調節剤。
4. G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩が、配列番号：45で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩である請求項1記載のオキシトシン分泌調節剤。
- 15 5. 配列番号：45で表されるアミノ酸配列が、配列番号：6、21または35である請求項4記載のオキシトシン分泌調節剤。
6. オキシトシン分泌促進剤である請求項1記載のオキシトシン分泌調節剤。
7. 微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶または乳汁うっ滞の改善、予防または治療薬である請求項6記載のオキシト
20 シン分泌促進剤。
8. オキシトシン分泌を調節するためのG蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩の使用。
9. オキシトシン分泌調節剤を製造するためのG蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩の使用。
- 25 10. G蛋白共役型レセプター蛋白質に対するリガンドペプチドまたはその塩を、オキシトシン分泌不全に関係する疾患を有する哺乳動物に投与することを特徴とするオキシトシン分泌を調節する方法。

図1

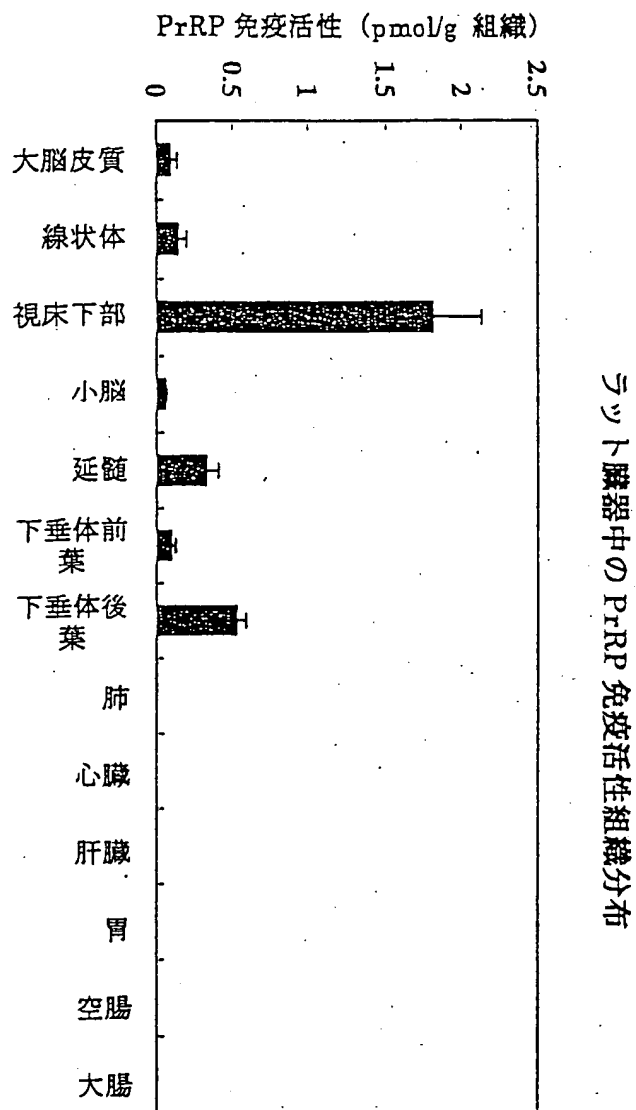
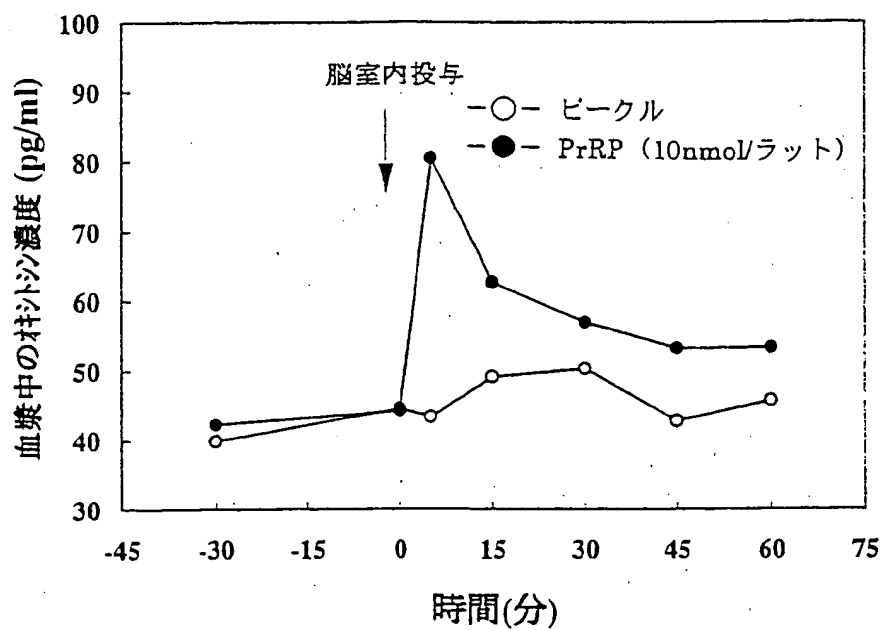


図2

雄性ウイスターラット第三脳室へ投与したPrRPの
血漿中のオキシトシン濃度に対する効果



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Use of Peptide

<130> 2584WOOP

<150> JP 10-369585

<151> 1998-12-25

<160> 45

<210> 1

<211> 98

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 1

Met Lys Ala Val Gly Ala Trp Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu

1 5 10 15

Ala Leu Gln Gly Ala Ala Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile

20 25 30

Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg

35 40 45

Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Ala Pro Gly Asp Gly Pro

50 55 60

Arg Pro Gly Pro Arg Arg Val Pro Ala Cys Phe Arg Leu Glu Gly Gly

65 70 75 80

Ala Glu Pro Ser Arg Ala Leu Pro Gly Arg Leu Thr Ala Gln Leu Val

85 90 95

Gln Glu

<210> 2

<211> 294

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 2

```
ATGAAGGCGG TGGGGGCTG GCTCCTCTGC CTGCTGCTGC TGGGCCTGGC CCTGCAGGGG   60
GCTGCCAGCA GAGCCACCA GCACTCCATG GAGATCCGCA CCCCCGACAT CAACCCTGCC   120
TGGTACGCRG GCCGTGGGAT CCGGCCCGTG GGCCGCTTCG GCCGGCGAAG AGCTGCCCCY   180
GGGGACGGAC CCAGGCCTGG CCCCCGGCGT GTGCCGGCCT GCTTCCGCCT GGAAGGCGGY   240
GCTGAGCCCT CCCGAGCCCT CCCGGGGCGG CTGACGGCCC AGCTGGTCCA GGAA       294
```

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 3

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20

25

30

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 4

3/17

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

<210> 5

<211> 33

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 5

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

33

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 6

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

<210> 7

4/17

<211> 21

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 7

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly

20

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 8

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

<210> 9

<211> 93

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 9

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60

GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCGC TTC 93

<210> 10

<211> 96

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 10

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60
GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCGC TTCGGC 96

<210> 11

<211> 99

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 11

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60
GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCGC TTCGGCCGG 99

<210> 12

<211> 60

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 12

ACCCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60

<210> 13

<211> 63

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 13

ACCCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60

GGC

63

<210> 14

<211> 66

<212> DNA

<213> Bovine

<400> 14

ACCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60

GGCCGG

66

<210> 15

<211> 98

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 15

Met Lys Ala Val Gly Ala Trp Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu

1

5

10

15

Ala Leu Gln Gly Ala Ala Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile

20

25

30

Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg

35

40

45

Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Ala Leu Gly Asp Gly Pro

50

55

60

Arg Pro Gly Pro Arg Arg Val Pro Ala Cys Phe Arg Leu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Ala Glu Pro Ser Arg Ala Leu Pro Gly Arg Leu Thr Ala Gln Leu Val

85

90

95

7/17

Gln Glu

<210> 16

<211> 83

<212> PRT

<213> Rat

<400> 16

Met Ala Leu Lys Thr Trp Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ser Leu Val

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Ser Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg

20 25 30

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

35 40 45

Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Thr Pro Arg Asp Val Thr Gly

50 55 60

Leu Gly Gln Leu Ser Cys Leu Pro Leu Asp Gly Arg Thr Lys Phe Ser

65 70 75 80

Gln Arg Gly

<210> 17

<211> 249

<212> DNA

<213> Rat

<400> 17

ATGGCCCTGA AGACGTGGCT TCTGTGCTTG CTGCTGCTAA GCTTGGTCCT CCCAGGGGCT 60

TCCAGCCGAG CCCACCAGCA CTCCATGGAG ACAAGAACCC CTGATATCAA TCCTGCCTGG 120

TACACGGGCC GCGGGATCAG GCCTGTGGGC CGCTTCGGCA GGAGAAGGGC AACCCCGAGG 180

GATGTCACTG GACTTGGCCA ACTCAGCTGC CTCCCACTGG ATGGACGCAC CAAGTTCTCT 240

CAGCGTGGA 249

<210> 18

<211> 31

<212> PRT

<213> Rat

<400> 18

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 19

<211> 32

<212> PRT

<213> Rat

<400> 19

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

<210> 20

<211> 33

<212> PRT

<213> Rat

<400> 20

9/17

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

Arg

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Rat

<400> 21

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe

20

<210> 22

<211> 21

<212> PRT

<213> Rat

<400> 22

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1 5 10 15

Val Gly Arg Phe Gly

20

<210> 23

<211> 22

10/17

<212> PRT

<213> Rat

<400> 23

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

<210> 24

<211> 93

<212> DNA

<213> Rat

<400> 24

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60

ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTC 93

<210> 25

<211> 96

<212> DNA

<213> Rat

<400> 25

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60

ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGC 96

<210> 26

<211> 99

<212> DNA

<213> Rat

<400> 26

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60

ACGGGCCCGC GGATCAGGCC TGTGGCCGC TTCGGCAGG 99

<210> 27

<211> 60

<212> DNA

<213> Rat

<400> 27

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGCCGCGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTC 60

<210> 28

<211> 63

<212> DNA

<213> Rat

<400> 28

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGCCGCGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTC 60

GGC 63

<210> 29

<211> 66

<212> DNA

<213> Rat

<400> 29

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGCCGCGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTC 60

GGCAGG 66

<210> 30

<211> 87

12/17

<212> PRT

<213> Human

<400> 30

Met Lys Val Leu Arg Ala Trp Leu Leu Cys Leu Leu Met Leu Gly Leu

1

5

10

15

Ala Leu Arg Gly Ala Ala Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile

20

25

30

Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg

35

40

45

Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Thr Leu Gly Asp Val Pro

50

55

60

Lys Pro Gly Leu Arg Pro Arg Leu Thr Cys Phe Pro Leu Glu Gly Gly

65

70

75

80

Ala Met Ser Ser Gln Asp Gly

85

<210> 31

<211> 261

<212> DNA

<213> Human

<400> 31

ATGAAGGTGC TGAGGGCCTG GCTCCTGTGC CTGCTGATGC TGGGCCTGGC CCTGCGGGGA 60

GCTGCAAGTC GTACCCATCG GCACTCCATG GAGATCCGCA CCCCTGACAT CAATCCTGCC 120

TGGTACGCCA GTCGCGGGAT CAGGCCTGTG GGCCGCTTCG GTCGGAGGAG GGCAACCCTG 180

GGGGACGTCC CCAAGCCTGG CCTGCGACCC CGGCTGACCT GCTTCCCCCT GGAAGGCGGT 240

GCTATGTCGT CCCAGGATGG C 261

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> Human

<400> 32

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20 25 30

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Human

<400> 33

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20 25 30

<210> 34

<211> 33

<212> PRT

<213> Human

<400> 34

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1 5 10 15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20

25

30

Arg

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Human

<400> 35

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg Phe

20

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Human

<400> 36

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg Phe Gly

20

<210> 37

<211> 22

<212> PRT

<213> Human

<400> 37

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg Phe Gly Arg

20

<210> 38

<211> 93

<212> DNA

<213> Human

<400> 38

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60

GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTC 93

<210> 39

<211> 96

<212> DNA

<213> Human

<400> 39

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60

GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGT 96

<210> 40

<211> 99

<212> DNA

<213> Human

<400> 40

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60

GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCCGC TTCGGTCGG

99

<210> 41

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 41

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

<210> 42

<211> 63

<212> DNA

<213> Human

<400> 42

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

GGT

63

<210> 43

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<400> 43

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

GGTCGG

66

<210> 44

<211> 31

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<221>

<223> Xaa on the 3rd position means Thr or Ala, Xaa on the 5th position means Arg or Gln, Xaa on the 10th position means Ile or Thr, Xaa on the 21st position means Thr or Ala, Xaa on the 22nd position means Gly or Ser.

<400> 44

Ser Arg Xaa His Xaa His Ser Met Glu Xaa Arg Thr Pro Asp Ile Asn

1

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Xaa Xaa Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20

25

30

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<221>

<223> Xaa on the 10th position means Thr or Ala, Xaa on the 11th position means Gly or Ser.

<400> 45

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Xaa Xaa Arg Gly Ile Arg Pro

1

5

10

15

Val Gly Arg Phe

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07199

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K38/00-58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2000	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	REGISTRY (STN)
BIOSIS (STN)	

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	MARUYAMA et al, 'Central administration of prolactin-releasing peptide stimulates oxytocin release in rats', Neuroscience Letters, 1999, Vol.276, pp193-196, Full text	1-7,9
PX	WO, 98/58962, A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.), & JP, 11-71300, A, Claim 9	7
PA	MARUYAMA et al, 'Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain', Endocrinology, 1999, Vol.140, No.5, pp2326-2333, Full text	1-7,9
A	HINUMA et al, 'A prolactin-releasing peptide in the brain', NATURE, 21 May, 1998, Vol.393, pp272-276, Full text	1-7,9
A	BOERSMA et al, 'Immunocytochemical localization of neuropeptide FF(FMRF amide-like peptide) in the hypothalamo-neurohypophyseal system of wistar and brattleboro rats by light and electron microscopy' THE JOURNAL OF COMPARATIVE	1-7,9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
14 March, 2000 (14.03.00)Date of mailing of the international search report
28 March, 2000 (28.03.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07199

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	NEUROLOGY, 1993, Vol. 336, pp555-570, Full text	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/07199

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8,10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 8 and 10 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by the International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: 1
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

No meaningful International Search can be carried out, since those skilled in the art cannot understand which peptides fall within the category of "ligand peptide to a G protein-coupled receptor protein".
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/00-58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	REGISTRY (STN)
BIOSIS (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	MARUYAMA et al, 'Central administration of prolactin-releasing peptide stimulates oxytocin release in rats', Neuroscience Letters, 1999年, 第276巻, pp193-196, 全文	1-7, 9
PX	WO, 98/58962, A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.), &, JP, 11-71300, A, 請求項9	7
PA	MARUYAMA et al, 'Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain', Endocrinology, 1999年, 第140巻, 第5号, pp2326-2333, 全文	1-7, 9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.03.00

国際調査報告の発送日

28.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子 印

4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HINUMA et al, 'A prolactin-releasing peptide in the brain', NATURE, 1998年5月21日, 第393巻, pp272-276、全文	1-7, 9
A	BOERSMA et al, 'Immunocytochemical localization of neuropeptide FF (FMRF amide-like peptide) in the hypothalamo- neurohypophyseal system of wistar and brattleboro rats by light and electron microscopy' THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY, 1993年, 第336巻, pp555-570、全文	1-7, 9

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8, 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 8, 10 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT 規則39.1(iV) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 1 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
「G蛋白共役型レセプタータンパク質に対するリガンドペプチド」は当業者がどのようなペプチドがそれに含まれるのかを理解することができないため、有意義な国際調査をすることができない。。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT 規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。